



JPW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Tsuyoshi SATO, et al.

GAU:

SERIAL NO: 10/820,712

EXAMINER:

FILED: April 9, 2004

FOR: ALKALINE PROTEASE

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e): Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2003-106708	April 10, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 4月10日
Date of Application:

出願番号 特願2003-106708
Application Number:

ST. 10/C]: [JP2003-106708]

願人 花王株式会社
Applicant(s):

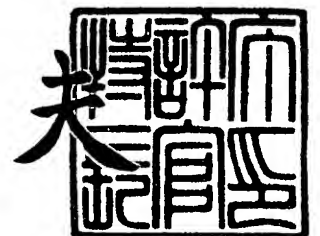
CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

BEST AVAILABLE COPY

2004年 4月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P01491504

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

C12N 9/50

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 佐藤 剛

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 奥田 光美

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 小山 伸吾

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 伊澤 啓文

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 小林 徹

【発明者】

【住所又は居所】 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内

【氏名】 野村 昌史

【特許出願人】

【識別番号】 000000918

【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000084

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

【代表者】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100117156

【弁理士】

【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100111028

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 164232

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アルカリプロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の (a) 63 位、(b) 89 位、(c) 120 位、(d) 63 位及び 187 位、(e) 226 位、(f) 296 位、(g) 304 位又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

- (a) 位置：セリン、
- (b) 位置：ヒスチジン、
- (c) 位置：アルギニン、
- (d) 位置：セリン、
- (e) 位置：チロシン、
- (f) 位置：バリン、
- (g) 位置：セリン、

であるアルカリプロテアーゼ。

【請求項 2】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列又はこれと 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼにおいて、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の (a) 63 位、(b) 89 位、(c) 120 位、(d) 63 位及び 187 位、(e) 226 位、(f) 296 位、(g) 304 位又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

- (a) 位置：セリン、
- (b) 位置：ヒスチジン、
- (c) 位置：アルギニン、
- (d) 位置：セリン、
- (e) 位置：チロシン、
- (f) 位置：バリン、
- (g) 位置：セリン、

であるアルカリプロテアーゼ。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載のアルカリプロテアーゼをコードする遺

伝子。

【請求項 4】 請求項 3 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 5】 請求項 4 記載のベクターを含む形質転換体。

【請求項 6】 宿主が微生物である請求項 5 記載の形質転換体。

【請求項 7】 請求項 1 又は 2 記載のアルカリプロテアーゼを含む洗浄剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は洗浄剤配合酵素として有用なアルカリプロテアーゼ及びそれをコードする遺伝子に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

産業分野でのプロテアーゼ利用の歴史は古く、衣料用洗剤をはじめとする洗浄剤から繊維の改質剤、皮革処理剤、化粧品、浴剤、食品改質剤或いは医薬品としての利用まで非常に多岐にわたっている。中でも最も工業的に大量に生産されているものが洗剤用プロテアーゼであり、例えば、アルカラーゼ、サビナーゼ（登録商標；ノボザイム）、マクサカル（登録商標；ジェネンコ）、ブラップ（登録商標；ヘンケル）、及び K A P（花王）等が知られている。

【0 0 0 3】

洗剤中にプロテアーゼを配合する目的は、衣料に付着したタンパク質汚れを分解することであるが、実際の汚れはタンパク質だけでなく皮脂由来の脂質や固体粒子等、有機物と無機物が入り混じった複数の成分を内包する複合汚れであり、このような複合汚れに対する洗浄性の高い洗浄剤が望まれていた。

【0 0 0 4】

斯かる観点から本発明者らは、高濃度の脂肪酸存在下でも十分なカゼイン分解活性を保持し、タンパク質だけでなく皮脂等の混在する複合汚れに対しても優れた洗浄性を有する分子量約 4 3, 0 0 0 のアルカリプロテアーゼを数種見出し、先に特許出願した（特許文献 1 参照）。斯かるアルカリプロテアーゼ群は、その

分子量、一次構造、酵素学的性質、特に非常に強い酸化剤耐性を有する点で、従来から知られているバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼであるズブチリシンとは異なり、新しいズブチリシンサブファミリーに分類することが提唱されている（非特許文献1参照）。

【0005】

このようなプロテアーゼを洗剤へ配合するためには培養液を濃縮した後に乾燥、造粒の工程があり、また洗剤の保存中における失活も防ぐ必要がある。さらにこのようなプロテアーゼをコードする遺伝子を改変し、比活性や生産量を増加させた変異体の中には変異前に比べ耐熱性が低下するという現象も認められていた。即ち、これらの問題を解決するために酵素の耐熱性を高めることが望まれている。

【0006】

従って、本発明は複合汚れに対しても優れた洗浄性を有すると共に、耐熱性の向上したアルカリプロテアーゼを提供することを目的とする。

【0007】

【特許文献1】

国際公開第99/18218号パンフレット

【非特許文献1】

Saekiら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 279, 313-319, 2000

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記アルカリプロテアーゼの特性を保持しつつ、耐熱性の向上した新たな酵素の探索を行ったところ、ある種のアルカリプロテアーゼにおいて、当該アミノ酸配列中の特定位置に特定のアミノ酸残基が必要であることを見出した。

【0009】

すなわち、本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列の（a）63位、（b）89位、（c）120位、（d）63位及び187位、（e）226位、（f）296位、（g）304位又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミ

ノ酸残基が下記アミノ酸残基；

- (a) 位置：セリン、
- (b) 位置：ヒスチジン、
- (c) 位置：アルギニン、
- (d) 位置：セリン、
- (e) 位置：チロシン、
- (f) 位置：バリン、
- (g) 位置：セリン、

であるアルカリプロテアーゼ、及びそれをコードする遺伝子を提供するものである。

【0010】

また本発明は、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換体を提供するものである。

【0011】

また本発明は、該アルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明のアルカリプロテアーゼは、上記のように、配列番号1で示されるアミノ酸配列の(a)63位、(b)89位、(c)120位、(d)63位及び187位、(e)226位、(f)296位、(g)304位又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

- (a) 位置：セリン、(b) 位置：ヒスチジン、(c) 位置：アルギニン、(d) 位置：セリン、(e) 位置：チロシン、(f) 位置：バリン、(g) 位置：セリン、であるものである。

【0013】

すなわち、本発明のアルカリプロテアーゼは、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼにおける前記(a)～(g)から選ばれる位置のアミノ酸残基又は他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列の当該位置に相

当する位置のアミノ酸残基が特定のアミノ酸残基であるプロテアーゼを意味し、これらは野生型、野生型の変異体或いは人為的に変異を施した変異体であってもよい。

【0014】

ここで、「他種アルカリプロテアーゼ」としては、野生型又は野生型の変異体であってもよく、酸化剤耐性を有し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 法による分子量が $43,000 \pm 2,000$ であることが好ましく、配列番号 1 に示すアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるものが挙げられる。特に好ましくは、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、pH 8 以上のアルカリ性領域で作用する、酸化剤耐性を有する、 50°C 、pH 10 で 10 分間処理したとき 80% 以上の残存活性を示す、ジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) 及びフェニルメタンスルホニルフルオライド (PMSF) で阻害され、SDS-PAGE による分子量が $43,000 \pm 2,000$ である酵素が挙げられる。ここで、酸化剤耐性を有するとは、当該アルカリプロテアーゼを 50 mM 過酸化水素、5 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM ブリットンロビンソン緩衝液 (pH 10) 中で、 30°C 、20 分間の放置後の残存活性が少なくとも 50% 以上を保持していることをいう。

【0015】

ここで、「配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼ」としては、KP43 [バチルス エスピー KSM-KP43 (FERM BP-6532) 由来、国際公開第 99/18218 号パンフレット] が挙げられ、「配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼ」としては、例えばプロテアーゼ KP9860 (GenBank Accession No. AB046403) [バチルス エスピー KSM-9860 (FERM BP-6534) 由来、国際公開 99/18218 号パンフレット]、プロテアーゼ 9865 (GenBank Accession No. AB084155) [バチルス エスピー KSM-9865 (FERM P-1592) 由来、特願 2002-002653]、プロテア

ーゼE-1 (GenBank Accession No. AB046402) [バチルス No. D-6 (FERM P-1592) 由来、特開昭49-71191号公報]、プロテアーゼYa (GenBank Accession No. AB046404) [バチルス エスピーY (FERM BP-1029) 由来、特開昭61-280268号公報]、プロテアーゼSD521 (GenBank Accession No. AB046405) [バチルス SD521 (FERM P-11162) 由来、特開平3-191781号公報]、プロテアーゼA-1 (GenBank Accession No. AB046406) [NCIB12289由来、国際公開第88/01293号パンフレット、]、プロテアーゼA-2 [NCIB12513由来、国際公開第98/56927号パンフレット]や、特開2002-218989号報、特開2002-306176号報に記載の変異プロテアーゼ、配列番号1で示されるアミノ酸配列の251位をそれぞれアスパラギン、スレオニン、イソロイシン、バリン、ロイシン及びグルタミンに置換した変異体、256位をそれぞれセリン、グルタミン、アスパラギン、バリン及びアラニンに置換した変異体 (特願2001-329472号)、配列番号1で示されるアミノ酸配列の65位をプロリンに置換した変異体、101位をアスパラギンに置換した変異体、273位をイソロイシン、グリシン及びスレオニンにそれぞれ置換した変異体、320位をフェニルアラニン、バリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン及びグリシンにそれぞれ置換した変異体、359位をセリン、ロイシン、バリン、イソロイシン及びグルタミンにそれぞれ置換した変異体、387位をアラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン及びヒスチジンにそれぞれ置換した変異体 (特願2002-304230号)、配列番号1で示されるアミノ酸配列の163位をヒスチジン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、リジン、アスパラギン、セリン、イソロイシン、ロイシン、グルタミン、スレオニン及びバリンに置換した変異体、170位をバリン及びロイシンに置換した変異体、171位をアラニン、グルタミン酸、グリシン及びスレオニンに置換した変異体 (特願2002-304231号) 又はこれらとアミノ酸配列において80%以上、好ましくは87%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上の相同性を有するアルカリプロテアー

ぜが挙げられる。

【0016】

なお、アミノ酸配列の相同性は、リップマン-パーソン (Lipman-Pearson) 法 (Science, 227, 1435, 1985) によって計算される。

【0017】

また、「相当する位置のアミノ酸残基」を特定する方法としては、例えばリップマン-パーソン法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較し、各アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列中に存在する保存アミノ酸残基に最大の相同性を与えることにより行うことができる。プロテアーゼのアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、アミノ酸配列中にある挿入、欠失にかかわらず、相同アミノ酸残基の各プロテアーゼにおける配列中の位置を決めることが可能である。相同位置は、三次元構造中で同位置に存在すると考えられ、対象のプロテアーゼの特異的機能に関して類似した効果を有することが推定できる。

【0018】

すなわち、上記方法でアミノ酸配列を整列させた図1より、(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列における63位のアミノ酸残基はアスパラギン残基であるが、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼKP9860においては63位のアスパラギン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はセリン残基であるのが好ましい。

【0019】

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列における89位のアミノ酸残基はグルタミン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼE-1においては88位のグルタミン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はヒスチジン残基であるのが好ましい。

【0020】

(c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列における120位のアミノ酸残基はセリン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記

の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ A-2 においては 119 位のセリン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、アルギニン残基であるのが好ましい。

【0021】

(d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 63 位及び 187 位のアミノ酸残基は共にアスパラギン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ SD-521 においては 63 位のアスパラギン残基及び 186 位のアスパラギン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、共にセリン残基であるのが好ましい。

【0022】

(e) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 226 位のアミノ酸残基はフェニルアラニン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ Ya においては 225 位のフェニルアラニン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、チロシン残基であるのが好ましい。

【0023】

(f) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 296 位のアミノ酸残基はイソロイシン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ 9865 においては 296 位のイソロイシン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、バリン残基であるのが好ましい。

【0024】

(g) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 304 位のアミノ酸残基はアスパラギン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ E-1 においては 303 位のアスパラギン酸残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、セリン残基であるのが好ましい。

【0025】

プロテアーゼ K P 4 3 のアミノ酸配列（配列番号 1）の（a）63 位、（b）89 位、（c）120 位、（d）63 位及び 187 位、（e）226 位、（f）296 位、（g）304 位に相当する位置及びアミノ酸残基の具体例を、上記「他種アルカリプロテアーゼ」のうちの好適に用いられるもので示す（表 1）。

【0026】

【表 1】

位置	プロテアーゼ							
	KP43	KP9860	9865	E-1	Ya	SD-521	A-1	A-2
(a)	Asn63	Asn63	Asn63	Asn63	Ser63	Asn63	Asn63	Asn63
(b)	Gln89	Gln89	Gln89	Gln88	Gln88	Gln88	Gln89	Gln88
(c)	Ser120	Ser120	Ser120	Asn119	Asn119	Asn119	Ser120	Ser119
(d)	Asn63, Asn187	Asn63, Asn187	Asn63, Asn187	Asn63, Asn186	Ser63, Asn186	Asn63, Asn186	Asn63, Asn187	Asn63, Asn186
(e)	Phe226	Tyr226	Phe226	Phe225	Phe225	Phe225	Phe226	Tyr225
(f)	Ile296	Val296	Ile296	Val295	Val295	Val295	Ile296	Val295
(g)	Asn304	Asn304	Asn304	Asp303	Asp303	Asp303	Asn304	Asn303

【0027】

また、本発明アルカリプロテアーゼにおけるアミノ酸残基の（a）～（g）の選択は、酵素活性及び酵素特性が変化しない限り 2 箇所以上が同時になされているもよい。2 箇所以上が同時になされた場合の好ましい具体例を以下に示す。尚、アミノ酸は 3 文字表記とし、「+」は 1 箇所の置換に対し付加された置換を表している。

【0028】

二重置換体の例としては、Asn63Ser+Asn187Ser、Asn63Ser+Ile296Val、Asn187Ser+Ile296Val、Ser120Arg+Phe226Tyr 等が挙げられるが、Asn63Ser+Asn187Ser が特に好ましい。さらに三重以上の各組合せでもよい。

【0029】

本発明のアルカリプロテアーゼが変異体である場合、変異を施す前のアルカリ

プロテアーゼ（親アルカリプロテアーゼということがある）としては、「配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるプロテアーゼ」又は上述した「他種アルカリプロテアーゼ」として示したものが該当し、これに目的部位の変異を施すことにより本発明のアルカリプロテアーゼが得られる。例えばプロテアーゼ K P 4 3 の配列番号1で示されるアミノ酸配列の前記（a）～（g）より選ばれる位置のアミノ酸残基又は他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列において当該位置に相当する位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換することにより得られる。

【0030】

本発明アルカリプロテアーゼは、例えば以下の方法により得ることができる。すなわち、クローニングされた親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子（配列番号2：成熟酵素領域すなわち配列番号1をコードする遺伝子は619番目のコドン以降で示される）に対して変異を施し、得られた変異遺伝子を用いて適当な宿主菌を形質転換し、当該組換え宿主菌を培養し、培養物から採取することにより得られる。親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニングは、一般的な遺伝子組換え技術を用いればよく、例えば国際公開第99/18218号パンフレット、国際公開第98/56927号パンフレットに記載の方法に従って行えばよい。

【0031】

親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子の変異手段としては、一般的に行われているランダム変異や部位特異的変異の方法がいずれも採用できる。より具体的には、例えばSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Km キット（タカラ）等を用いて行うことができる。また、リコンビナントPCR（polymerase chain reaction）法（PCR protocols, Academic press, New York, 1990）を用いることによって、遺伝子の任意の配列を他の遺伝子の該任意の配列に相当する配列と置換することが可能である。

【0032】

得られた変異遺伝子を用いた本発明プロテアーゼの生産方法としては、例えば当該変異遺伝子を安定に増幅できるDNAベクターに連結させ宿主菌を形質転換

する、或いは当該変異遺伝子を安定に維持できる宿主菌の染色体DNA上に導入させる、等の方法が採用できる。この条件を満たす宿主菌としては例えばバチルス属細菌、大腸菌、カビ、酵母、放線菌などが挙げられ、これらの菌株を用い、資化性の炭素源、窒素源その他必須栄養素を含む培地に接種し、常法に従い培養すればよい。

【0033】

斯くして得られた培養液中からのアルカリプロテアーゼの採取、及び精製は、一般の酵素の採取、及び精製方法に準じて行うことができる。例えば、培養液を遠心分離、又は濾過することで菌体を除き、培養上清液から常法の精製手段により目的酵素を得る。このようにして得られる酵素液は、そのまま用いることもできるが、更に公知の方法により精製、結晶化、粉末化、または顆粒化することもできる。

【0034】

得られた本発明のアルカリプロテアーゼは、酸化剤耐性を有し、高濃度の脂肪酸によるカゼイン分解活性の阻害を受けず、SDS-PAGEによる分子量が43,000±2,000であり、アルカリ性域で活性を有すると共に、親アルカリプロテアーゼに比べ耐熱性の向上が認められるという性質を新に獲得したものである。

従って、本発明のアルカリプロテアーゼは、各種洗剤組成物配合用酵素として有用である。

【0035】

洗浄剤組成物中への本発明品プロテアーゼの配合量は、アルカリプロテアーゼが活性を示す量であれば特に制限されないが、洗浄剤組成物1kg当たり0.1～5000PUが配合できるが、経済性等を考慮し、500PU以下が好ましい。

【0036】

本発明の洗浄剤組成物は本発明品プロテアーゼ以外に様々な酵素を併用することもできる。例えば、加水分解酵素、酸化酵素、還元酵素、トランスフェラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、シンテターゼ等である。このうち、本発

明以外のプロテアーゼ、セルラーゼ、ケラチナーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、プルラナーゼ、ペクチナーゼ、マンナナーゼ、グルコシダーゼ、グルカナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ等が好ましく、特にプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、リパーゼが好ましい。プロテアーゼとしては市販のアルカラーゼ、エスペラーゼ、サビナーゼ、エバラーゼ、カンナーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、プロペラーゼ、プラフェクト（登録商標；ジェネンコア社）、また K A P（花王）、等が挙げられる。セルラーゼとしてはセルザイム、ケアザイム（登録商標；ノボザイムズ社）、また K A C、特開平 1 0 - 3 1 3 8 5 9 号公報記載のバチルス・エスピー K S M - S 2 3 7 株が生産するアルカリセルラーゼ、特願 2 0 0 2 - 1 1 6 5 5 3 号公報記載の変異アルカリセルラーゼ（以上、花王）等が挙げられる。アミラーゼとしてはターマミル、デュラミル（登録商標；ノボザイムズ社）、プラスター（登録商標；ジェネンコア社）、また K A M（花王）、等が挙げられる。リパーゼとしてはリポラーゼ、リポラーゼウルトラ（登録商標；ノボザイムズ社）が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

洗浄剤組成物中で本発明品プロテアーゼ以外のプロテアーゼを併用する場合の配合量は、洗浄剤組成物 1 k g 当たり 0 . 1 ~ 5 0 0 P U が好ましい。セルラーゼを併用する場合は、特開平 1 0 - 3 1 3 8 5 9 号公報の段落〔 0 0 2 0 〕に記載の酵素活性測定方法より決定される単位（K U）に基づき、洗浄剤組成物 1 k g 当たり 3 0 0 ~ 3 0 0 0 0 0 0 K U が好ましい。

【 0 0 3 8 】

またアミラーゼを併用する場合は、特開平 1 1 - 4 3 6 9 0 号公報の段落〔 0 0 4 0 〕記載のアミラーゼ活性測定方法より決定される単位（I U）に基づき、洗浄剤組成物 1 k g 当たり 5 0 ~ 5 0 0 0 0 0 I U が好ましい。

【 0 0 3 9 】

さらにリパーゼを併用する場合は、特表平 8 - 5 0 0 0 1 3 号公報の実施例 1 記載のリパーゼ活性測定方法より決定される単位（L U）に基づき、洗浄剤組成物 1 k g 当たり 1 0 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 0 L U が好ましい。

【0040】

本発明の洗浄剤組成物には公知の洗浄剤成分を配合することができ、当該公知の洗浄剤成分としては、例えば次のものが挙げられる。

【0041】**(1) 界面活性剤**

界面活性剤は洗浄剤組成物中 0.5～60 質量% 配合され、特に粉末状洗浄剤組成物については 10～45 質量%、液体洗浄剤組成物については 20～50 質量% 配合することが好ましい。また本発明洗浄剤組成物が漂白剤、または自動食器洗浄機用洗剤である場合、界面活性剤は一般に 1～10 質量%、好ましくは 1～5 質量% 配合される。

【0042】

本発明洗浄剤組成物に用いられる界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤の 1 種または組み合わせを挙げることが出来るが、好ましくは陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤である。

【0043】

陰イオン性界面活性剤としては、炭素数 10～18 のアルコールの硫酸エステル塩、炭素数 8～20 のアルコールのアルコキシル化物の硫酸エステル塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、パラフィンスルホン酸塩、 α -オレフィンスルホン酸塩、 α -スルホ脂肪酸塩、 α -スルホ脂肪酸アルキルエステル塩又は脂肪酸塩が好ましい。本発明では特に、アルキル鎖の炭素数が 10～14 の、より好ましくは 12～14 の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩が好ましく、対イオンとしては、アルカリ金属塩やアミン類が好ましく、特にナトリウム及び／又はカリウム、モノエタノールアミン、ジエタノールアミンが好ましい。

【0044】

非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシアルキレンアルキル（炭素数 8～20）エーテル、アルキルポリグリコシド、ポリオキシアルキレンアルキル（炭素数 8～20）フェニルエーテル、ポリオキシアルキレンソルビタン脂肪酸（炭素数 8～22）エステル、ポリオキシアルキレングリコール脂肪酸（炭素数 8～

22) エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマーが好ましい。特に、非イオン性界面活性剤としては、炭素数10～18のアルコールにエチレンオキシドやプロピレンオキシド等のアルキレンオキシドを4～20モル付加した〔HLB値（グリフィン法で算出）が10.5～15.0、好ましくは11.0～14.5であるような〕ポリオキシアルキレンアルキルエーテルが好ましい。

【0045】

(2) 二価金属イオン捕捉剤

二価金属イオン捕捉剤は0.01～50質量%、好ましくは5～40質量%配合される。本発明洗浄剤組成物に用いられる二価金属イオン捕捉剤としては、トリポリリン酸塩、ピロリン酸塩、オルソリン酸塩などの縮合リン酸塩、ゼオライトなどのアルミノケイ酸塩、合成層状結晶性ケイ酸塩、ニトリロ三酢酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩、クエン酸塩、イソクエン酸塩、ポリアセタールカルボン酸塩などが挙げられる。このうち結晶性アルミノケイ酸塩（合成ゼオライト）が特に好ましく、A型、X型、P型ゼオライトのうち、A型が特に好ましい。合成ゼオライトは、平均一次粒径0.1～10 μ m、特に0.1～5 μ mのものが好適に使用される。

【0046】

(3) アルカリ剤

アルカリ剤は0.01～80質量%、好ましくは1～40質量%配合される。粉末洗剤の場合、デンス灰や軽灰と総称される炭酸ナトリウムなどのアルカリ金属炭酸塩、並びにJIS1号、2号、3号などの非晶質のアルカリ金属珪酸塩が挙げられる。これら無機性のアルカリ剤は洗剤乾燥時に、粒子の骨格形成において効果的であり、比較的硬く、流動性に優れた洗剤を得ることができる。これら以外のアルカリとしてはセスキ炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなどが挙げられ、またトリポリリン酸塩などのリン酸塩もアルカリ剤としての作用を有する。また、液体洗剤に使用されるアルカリ剤としては、上記アルカリ剤の他に水酸化ナトリウム、並びにモノ、ジ又はトリエタノールアミンを使用することができ、活性剤の対イオンとしても使用できる。

【0047】

(4) 再汚染防止剤

再汚染防止剤は0.001～10質量%、好ましくは1～5質量%配合される。本発明洗浄剤組成物に用いられる再汚染防止剤としてはポリエチレングリコール、カルボン酸系ポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。このうちカルボン酸系ポリマーは再汚染防止能の他、金属イオンを捕捉する機能、固体粒子汚れを衣料から洗濯浴中へ分散させる作用がある。カルボン酸系ポリマーはアクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸などのホモポリマーないしコポリマーであり、コポリマーとしては上記モノマーとマレイン酸の共重合したものが好適であり、分子量が数千～10万のものが好ましい。上記カルボン酸系ポリマー以外に、ポリグリシジル酸塩などのポリマー、カルボキシメチルセルロースなどのセルロース誘導体、並びにポリアスパラギン酸などのアミノカルボン酸系のポリマーも金属イオン捕捉剤、分散剤及び再汚染防止能を有するので好ましい。

【0048】

(5) 漂白剤

例えば過酸化水素、過炭酸塩などの漂白剤は1～10質量%配合するのが好ましい。漂白剤を使用するときは、テトラアセチルエチレンジアミン (TAED) や特開平6-316700号公報記載などの漂白活性化剤 (アクチベーター) を0.01～10質量%配合することができる。

【0049】

(6) 蛍光剤

本発明洗浄剤組成物に用いられる蛍光剤としてはビフェニル型蛍光剤 (例えばチノパールCBS-Xなど) やスチルベン型蛍光剤 (例えばDM型蛍光染料など) が挙げられる。蛍光剤は0.001～2質量%配合するのが好ましい。

【0050】

(7) その他の成分

本発明品洗浄剤組成物には、衣料用洗剤の分野で公知のビルダー、柔軟化剤、還元剤 (亜硫酸塩など)、抑泡剤 (シリコーンなど)、香料、その他の添加剤を

含有させることができる。

【0 0 5 1】

本発明の洗浄剤組成物は、上記方法で得られた本発明品プロテアーゼ及び上記公知の洗浄成分を組み合わせることで常法に従って製造することができる。洗浄剤の形態は用途に応じて選択することができ、例えば液体、粉体、顆粒、ペースト、固形などに行うことができる。

【0 0 5 2】

斯くして得られる本洗浄剤組成物は、衣料洗浄剤、漂白剤、硬質表面洗浄用洗浄剤、排水管用洗浄剤、義歯洗浄剤、医療器具用の殺菌洗浄剤などとして使用することができる。

【0 0 5 3】

【実施例】

実施例 1

バチルス エスピー K S M - K P 4 3 株由来のアルカリプロテアーゼの変異体であるPhe46Leu、Tyr195Gly、またはPhe46Leu+Tyr195Glyは比活性向上に非常に有効であることが判っている（特開 2 0 0 2 - 2 1 8 9 8 9 号公報）。しかし、これらの変異体を 7 0 ℃で 1 5 分間処理すると親アルカリプロテアーゼは処理前に比べ 7 0 - 8 0 %の残存活性を有するが比活性向上変異体の残存活性は、5 - 2 5 %まで低下することが認められた。そこでこれら変異体の遺伝子にランダム変異を与え、耐熱性の向上する変異体を取得した。即ち、変異体の構造遺伝子約 2 k b を pKF18k（タカラ）に導入して鋳型 DNA とし（3 0 n g）、Taq ポリメラーゼ（2 . 5 U）、BcaBEST Sequencing primer RV-M 及び BcaBEST Sequencing primer M13-47（タカラ；2 0 p m o L ずつ）、各 dNTP（2 0 p m o L ずつ）、Takara Taq 添付反応バッファー、適当量の硫酸マンガン及びジメチルスルフォキシドを用いて PCR を行った。PCR の条件は、9 4 ℃で 1 分間鋳型 DNA を変性させた後、9 4 ℃で 1 分間、5 5 ℃で 2 分間、7 2 ℃で 3 分間を 1 サイクルとし 3 0 サイクル反応させた後、7 2 ℃、1 0 分間放置した。

【0 0 5 4】

変異導入後の PCR 産物を High Pure PCR Production Purification キット（

ロッシュ)にて精製し、100 μ Lの滅菌水で溶出した。得られた約2 kbのDNA断片BamHI、XbaI (ロッシュ)により切断した後、同じ酵素で処理しておいたpKF18kと混合し、DNA Ligation キット (ver.2:タカラ)にて16℃、12時間結合反応を行った。反応液のエタノール沈殿によりDNAを回収し、大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換体はスキムミルク及びカナマイシンを含むLB寒天培地上に生育させた。

【0055】

カナマイシン耐性でスキムミルク溶解斑を示すものを選抜し、スキムミルク及びカナマイシンを含むLB培地に接種し、30℃で72時間振盪培養を行った。培養上清の活性は、合成基質法により測定した(後述)。即ち、培養上清について70℃、15分間の処理を施した系と未処理の系の双方について測定し、熱処理後の残存活性を調べた。変異前のプロテアーゼよりも10-50%程度耐熱性の向上した変異体についてはコロニーPCRにより、遺伝子を増幅し、精製した後、Big Dye DNA Sequencing キット (アプライドバイオシステム)を用い、DNA Sequencer 377型 (アプライドバイオシステム)にて塩基配列を決定した。その結果、耐熱性向上変異体として63位のアスパラギンがセリン、89位のグルタミンがヒスチジン、120位のセリンがアルギニン、187位のアスパラギンがセリン、226位のフェニルアラニンがチロシン、296位のイソロイシンがバリン、304位のアスパラギンがセリン、63位及び187位のアスパラギンがセリンにそれぞれ置換された変異体が取得された。

【0056】

実施例 2

実施例1で得られた耐熱性向上に効果のあった変異点を配列番号1に示すプロテアーゼKP43へそれぞれ導入し、耐熱性の評価を行うために部位特異的変異を行った。

変異導入用鋳型プラスミドの作製は、pKF18kのマルチクローニングサイト中のBamHI、XbaI切断部位に、プロテアーゼKP43をコードする遺伝子(配列番号2)を導入することにより構築した。

【0057】

部位特異的変異導入用PCRにはTakara LA Taq (タカラ) を用いた。5' 末端をリン酸化したセレクションプライマー (Mutan Super Express Kmキット添付) 及びプライマー1~7 (配列番号3~9) の各変異導入用プライマーを各々20 pmol 及び鑄型プラスミド30 ngを用い変異導入PCRを行った。反応条件は94℃で1分間鑄型DNAを変性させた後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で4分間を1サイクルとし、これを30サイクル行った。得られたPCR断片を精製してこれをプライマーとし、鑄型プラスミド30 ngとLA Taqを用いて再度PCRを行った。反応条件は94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で4分間を1サイクルとし、これを30サイクル行った。得られたPCR産物を精製し、ライゲーション反応を行った後、大腸菌MV1184株を形質転換することにより、変異導入プラスミドを得た。得られたプラスミドのアルカリプロテアーゼ遺伝子に関して塩基配列を決定し、変異部位を確認した。

また、各変異の組合せは、上記変異体を基にプライマー1~7を用いてPCRを行うことで二重変異体を作製した。

【0058】

次いで変異の導入されたアルカリプロテアーゼの生産並びに評価を行うのに適した系としてバチルス属細菌内で複製可能であるpHA64 (特開2000-287687号公報: プロモーター64の下流にBamHI、XbaI切断部位を有する) とバチルス エスピー KSM-9865株 (FERM P-18566) を選抜した。そこで得られた各変異導入プラスミドをBamHI、XbaIにて処理し、同酵素にて処理したpHA64を混合した後、DNA Ligation キット (ver.2:タカラ) により、結合反応を行った。エタノール沈殿により、リガーゼ反応液からDNAを回収し、以後の形質転換用のDNAとした。

【0059】

KSM-9865株の形質転換体をスキムミルク含有アルカリ寒天培地[スキムミルク(ディフコ) 1% (w/v)、バクトトリプトン(ディフコ) 1%、酵母エキス(ディフコ) 0.5%、塩化ナトリウム1%、寒天1.5%、炭酸ナトリウム0.05%、テトラサイクリン15 ppm]に生育させ、ハローの形成状況により、変異プロテアーゼ遺伝子導入の有無を判定した。形質転換体は、5 mL

の種母培地[6.0% (w/v) ポリペプトンS、0.05%酵母エキス、1.0%マルトース、0.02%硫酸マグネシウム7水和物、0.1%リン酸2水素カリウム、0.25%炭酸ナトリウム、30 ppm テトラサイクリン]に植菌し、30℃で16時間振盪培養を行った。次いで30 mLの主培地[8%ポリペプトンS、0.3%酵母エキス、10%マルトース、0.04%硫酸マグネシウム7水和物、0.2%リン酸2水素カリウム、1.5%無水炭酸ナトリウム、30 ppm テトラサイクリン]に種母培養液を1% (v/v) 植菌し、30℃で3日間振盪培養を行った。

【0060】

実施例3

それぞれの培養上清について50 mMホウ酸緩衝液 (pH 10.5 : 2 mM塩化カルシウム添加または無添加)、50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7 : 2 mM塩化カルシウム添加) あるいは2 mM塩化カルシウム水溶液内で60~80℃で10分間処理し、残存活性をカゼイン法にて測定した。熱処理前の活性に対する活性残存率を求めると、いずれの変異体においてもそれぞれの条件下で親アルカリプロテアーゼの活性残存率よりも上回り、耐熱性の向上が確認された。結果の一例を図2及び3に各プロテアーゼの一定温度下での活性半減期(残存活性が50%となるまでの時間)として表したが、いずれの場合においても半減時間は親アルカリプロテアーゼの1.2~7倍まで上昇することが判った。

【0061】

上記変異により得られる、アルカリプロテアーゼ変異体は耐熱性向上を示す以外は親アルカリプロテアーゼの特性、すなわち、酸化剤耐性を有し、高濃度の脂肪酸によるカゼイン分解活性の阻害を受けず、SDS-PAGEにより認められる分子量が43,000±2,000であり、アルカリ性域で活性を有する性質を保持していることを確認した。

【0062】

参考例

<プロテアーゼ活性測定法(合成基質法)>

0.05 mLの6 mM合成基質 (Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA : ペプチド研究所

を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.5) に 0.05 mL の酵素液を添加し反応を開始した。反応はマイクロプレートリーダー (iEMS reader MF: ラブシステムズ) 内にて行い、30℃、15 分間恒温した。活性は 414 nm における吸光度の増加を指標とし、プロテアーゼ 1 単位は上記条件下において 1 分間に吸光度が 0.001 増加する酵素量とした。

【0063】

＜プロテアーゼ活性測定法 (カゼイン法)＞

カゼイン (ハンマーステイン氏法: メルク) 1% (w/v) を含む 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.5) 1 mL を 30℃、5 分間恒温した後、0.1 mL の酵素液を添加し反応を開始した。15 分間反応させた後、2 mL の反応停止液 (0.11 M トリクロロ酢酸 / 0.22 M 酢酸ナトリウム / 0.33 M 酢酸) を加えた。室温で 30 分間放置し、沈殿物をワットマン No 1 濾紙を用いて濾過した。分解産物は Lowry らの方法により定量した。即ち、0.5 mL の濾液に 2.5 mL のアルカリ性銅溶液 (1% ロッシェル塩: 1% 硫酸銅・5 水和物: 2% 炭酸ナトリウム / 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 = 1:1:100) を加え、30℃ で 10 分間恒温した後、0.25 mL のフェノール試薬 [市販のフェノール試薬 (関東化学) を脱イオン水にて 2 倍に希釈した溶液] を添加、よく攪拌し、30℃ で 30 分間放置した。その後、660 nm における吸光度を測定した。プロテアーゼ 1 単位 (1 PU) は、上記反応条件下において 1 分間に 1 mmol のチロシンに相当する酸可溶性タンパク質を生成するのに必要な酵素量とした。

【0064】

実施例 4

(1) 洗剤の調製

攪拌翼を有した 1 m³ の混合槽に水 465 kg を加え、水温が 55℃ に達した後、40% (w/v) ポリアクリル酸ナトリウム水溶液 135 kg を添加した。15 分間攪拌した後に、炭酸ナトリウム 120 kg、硫酸ナトリウム 60 kg、亜硫酸ナトリウム 9 kg、蛍光染料 3 kg を添加した。更に 15 分間攪拌した後に、ゼオライト 300 kg を添加し、30 分間攪拌して均質なスラリーを得た (スラリー中の水分は 50 質量%)。このスラリーを噴霧乾燥塔の塔頂付近に設置

した圧力噴霧ノズルから噴霧することでベース顆粒を得た（噴霧乾燥塔に供給する高温ガスは塔下部より温度が225℃で供給し、塔頂より105℃で排出）。

【0065】

次にレディゲミキサー（松阪技研（株）製、容量20L、ジャケット付）に上記ベース顆粒100質量部を投入し、主軸（150rpm）の攪拌下、非イオン性界面活性剤20質量部、直鎖アルキル（炭素数10～13）ベンゼンスルホン酸ナトリウム22質量部、脂肪酸（炭素数14～18）ナトリウム4質量部、ポリエチレングリコール2質量部、水4質量部の混合液を3分間で投入し、その後5分間攪拌を行った。更にこのミキサーに結晶性ケイ酸ナトリウム20質量部とゼオライト10質量部を投入し、表面被覆を行い洗剤ベースを得た。

洗剤ベース99質量%に本発明品プロテアーゼ粒子0.5質量%、及び香料0.5質量%を混合して最終粒状洗剤Aを得た。

【0066】

（2）使用した原料

非イオン性界面活性剤：エチレンオキサイド平均付加モル数が8.5のエマルゲン108KM（花王（株）製）

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液：平均分子量10000（特公平2-24283号公報の実施例に記載の方法に従って製造した）

炭酸ナトリウム：デンス灰（セントラル硝子（株）製）

ゼオライト：平均粒径が3.5μmのゼオライト4A型（東ソー（株）製）

ポリエチレングリコール：K-PEG6000（平均分子量8500，花王（株）製）

結晶性ケイ酸ナトリウム：粉末SKS-6（ヘキストトクヤマ（株）製）

本発明品プロテアーゼ粒子：表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物（6PU/g）

蛍光染料：チノパールCBS-X（チバガイギー社製）

【0067】

実施例5

(1) 洗剤の調製

まず固形分 50 質量%のスラリーを熱風温度 250℃で噴霧乾燥し、ポリアク
リル酸ナトリウム（質量平均分子量 10000）7 質量%、炭酸ナトリウム 26
質量%、硫酸ナトリウム 20 質量%、塩化ナトリウム 6 質量%、蛍光染料 0.5
質量%、ゼオライト 40 質量%、水 0.5 質量%のベース顆粒を得た。

【0068】

次にレディゲミキサー（松阪技研（株）製、容量 20 L、ジャケット付）に上
記ベース顆粒 100 質量部を投入し、主軸（150 rpm）の攪拌下、非イオン
性界面活性剤 20 質量部、直鎖アルキル（炭素数 10～13）ベンゼンスルホン
酸ナトリウム 22 質量部、脂肪酸（炭素数 14～18）ナトリウム 4 質量部、ポ
リエチレングリコール 2 質量部、水 4 質量部の混合液を 3 分間で投入し、その後
5 分間攪拌を行った。更にこのミキサーに結晶性ケイ酸ナトリウム 20 質量部と
ゼオライト 10 質量部を投入し、表面被覆を行い洗剤ベースを得た。

【0069】

洗剤ベース 95 質量%に漂白剤粒子 2.8 質量%、漂白活性剤粒子 1.2 質量
%、本発明品プロテアーゼ粒子 0.5 質量%、及び香料 0.5 質量%を混合して
最終粒状洗剤 B を得た。

【0070】

(2) 使用した原料

非イオン性界面活性剤：エチレンオキサイド平均付加モル数が 8.5 のエマル
ゲン 108 KM（花王（株）製）

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液：平均分子量 10000（特公平 2-242
83 号公報の実施例に記載の方法に従って製造した）

炭酸ナトリウム：デンス灰（セントラル硝子（株）製）

ゼオライト：平均粒径が 3.5 μm のゼオライト 4A 型（東ソー（株）製）

ポリエチレングリコール：K-PEG 6000（平均分子量 8500，花王（
株）製）

結晶性ケイ酸ナトリウム：SKS-6（ヘキストクヤマ（株）製）

本発明品プロテアーゼ粒子：表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製

標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物(6PU/g)

蛍光染料:チノパールCBS-X(チバガイギー社製)

漂白剤粒子:炭酸ナトリウム・過酸化水素付加物(特開2000-256699号公報の段落[0019]記載の漂白剤粒子と同様にして得た)

漂白活性剤粒子:ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムの造粒物(特開2000-256699号公報の段落[0018]記載の漂白活性剤粒子と同様にして得た)

【0071】

実施例6

表2に示す液体洗浄剤組成物(洗剤C、及び洗剤D)を調製した。

【0072】

【表2】

成分	洗剤C (質量%)	洗剤D (質量%)
非イオン性界面活性剤 ¹⁾	25.0	-
非イオン性界面活性剤 ²⁾	5.0	-
非イオン性界面活性剤 ³⁾	10.0	-
非イオン性界面活性剤 ⁴⁾	-	9.0
非イオン性界面活性剤 ⁵⁾	-	9.0
非イオン性界面活性剤 ⁶⁾	-	2.5
陰イオン界面活性剤 ⁷⁾	1.0	-
シリコーン ⁸⁾	-	0.8
カルボン酸系ポリマー ⁹⁾	2.0	-
ポリマー ¹⁰⁾	-	0.8
クエン酸	0.2	-
塩化カルシウム	0.05	-
モノエタノールアミン	4.0	-
トリエチレングリコールフェニルエーテル	3.0	-
プロピレングリコール	3.0	-
エタノール	2.0	2.0
亜硫酸ナトリウム	0.2	-
本発明品プロテアーゼ ¹¹⁾	0.5	1.0
香料	0.5	0.5
水	残部	残部
合計	100	100
使用濃度	20g/30L	40g/30L
洗浄液のpH	10.5	7.3

【0073】

1) 炭素数12～14の2級アルコール由来のアルキル基を有するポリオキシエチレン（平均7モル付加）アルキルエーテル（ソフタノール70、日本触媒化学工業製）

2) 炭素数12～14の2級アルコール由来のアルキル基を有するポリオキシエチレン（平均12モル付加）アルキルエーテル（ソフタノール120、日本触媒化学工業製）

3) 炭素数10～14の直鎖第1級アルコールにEOを平均5モル、POを平均2モル、EOを平均3モルの順にブロック付加させたもの

4) ポリオキシエチレンラウリルエーテル、EOを平均8モル付加させたもの

5) ポリオキシエチレンラウリルエーテル、EOを平均11.5モル付加させたもの

6) ナローレンジポリオキシエチレンアルキル（sec-C₁₂/C₁₃）エーテル

7) 炭素数10～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム

8) アミド／エーテル変性シリコーンポリマー（東レ・ダウコーニングシリコーン（株）製、BY16-906）

9) 特開平10-60476号公報の11頁6行～13行に記載の方法で合成したフェノキシポリエチレングリコール、アクリル酸、マレイン酸共重合体（質量平均分子量10000、固形分51.2%）

10) ペンテン／マレイン酸（50／50モル比）コポリマーのナトリウム塩（質量平均分子量7000）

11) 表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品（15PU/mL）

【0074】

実施例7

下記の表3に示す組成のうち、過炭酸ナトリウムと炭酸ナトリウム（デンス灰）を攪拌混合しながら、ポリアクリル酸ナトリウム40%水溶液、及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、又は非イオン性界面活性剤、又はラウロイ

ルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムを添加した。次いで特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した本発明のアルカリプロテアーゼ粒子を添加し、全体的に均一になる程度攪拌することにより、漂白剤を調製した。

【0075】

【表3】

成分	漂白剤E (質量%)	漂白剤F (質量%)
過炭酸ナトリウム ¹⁾	72.0	72.0
炭酸ナトリウム (デンス灰)	20.0	20.0
陰イオン性界面活性剤 ²⁾	2.0	-
非イオン性界面活性剤 ³⁾	-	2.0
ポリアクリル酸ナトリウム ⁴⁾	1.0	1.0
ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム	4.0	4.0
本発明アルカリプロテアーゼ ⁵⁾	1.0	1.0

【0076】

- 1) 粒経500～700 μ m
- 2) 炭素数12～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム
- 3) ポリオキシエチレンアルキルエーテル (アルキル基の炭素数12～14、EO平均付加モル数12)
- 4) 平均分子量8,000
- 5) 表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

【0077】

実施例8

下記の表4に示す全自動食器洗浄機用洗浄剤組成物 (洗剤G、及びH) を調製した。

【0078】

【表 4】

成分	洗剤G (質量%)	洗剤H (質量%)
ブルロニック L-61 ¹⁾	-	4.0
ソフタノール EP-7085 ²⁾	4.0	-
クエン酸 3 ナトリウム	-	30.0
トリポリリン酸ナトリウム	30.0	-
過炭酸ナトリウム	20.0	20.0
炭酸ナトリウム	20.0	20.0
非晶質珪酸塩 ³⁾	10.0	10.0
AA-MA ⁴⁾	4.0	4.0
硫酸ナトリウム	10.0	10.0
α -アミラーゼ ⁵⁾	1.0	1.0
本発明アルカリプロテアーゼ ⁶⁾	1.0	1.0

【0079】

1) ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体 (平均分子量 2,000)

2) 炭素数 12~14 の sec-アルコールのエチレンオキサイド 7 モル、及びプロピレンオキサイド 8.5 モル付加物

3) JIS 2号珪酸ナトリウム

4) アクリル酸-マレイン酸共重合体

5) デュラミル 60T (登録商標; ノボザイムズ社製)

6) 表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

【0080】

実施例 9

下記の表 5 に示す各成分を用い、硬質表面用洗浄剤組成物 (洗剤 J) を得た。

【0081】

【表 5】

成分	洗剤 J (質量%)
陰イオン界面活性剤 ¹⁾	15.0
非イオン界面活性剤 ²⁾	5.0
非イオン界面活性剤 ³⁾	5.0
両性界面活性剤 ⁴⁾	7.5
両性界面活性剤 ⁵⁾	4.0
クエン酸	1.0
ポリプロピレングリコール ⁶⁾	2.0
エタノール	5.0
本発明品プロテアーゼ ⁷⁾	1.0
香料、水、その他／pH調整剤	54.5
合計	100.0

【0082】

1) ポリオキシエチレン (EOP=4) アルキル (C12) エーテル硫酸エステルナトリウム

2) ポリオキシエチレン (EOP=8) アルキル (C12) エーテル

3) アルキル (C12) ポリグルコシド (縮合度 1.3)

4) モノ長鎖第3級アルキル (C12) ジメチルアミノオキシド

5) アルキル (C12) ヒドロキシジメチルスルホベタイン

6) 分子量 10000

7) 表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品 (15PU/mL)

【0083】

実施例 10

前記洗剤 A (実施例 2 参照) を用いて下記表 6 記載の粒状洗剤を得た。

【0084】

【表 6】

成分 (質量%)	洗剤K	洗剤L	洗剤M	洗剤N
実施例 2 の洗剤ベース	98.4	98.3	98.5	97.2
香料	0.5	0.5	0.5	0.5
本発明品プロテアーゼ ¹⁾	0.5	0.5	0.5	0.5
従来プロテアーゼ ²⁾	0.6			0.6
セルラーゼ ³⁾		0.7		0.7
リパーゼ ⁴⁾			0.5	0.5

【0085】

1) 表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

2) 特開平 5-25492 号公報に記載のプロテアーゼ K-16 を特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき、5PU/g としたもの

3) KAC-500 (登録商標; 花王 (株) 製)

4) リポラーゼ 100T (登録商標; ノボザイムズ社製)

【0086】

【発明の効果】

本発明によれば、高濃度の脂肪酸存在下でも活性を有し、タンパク質だけでなく皮脂等の混在する複合汚れに対しても優れた洗浄性を有すると共に、耐熱性の高いアルカリプロテアーゼを提供できる。

【0087】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Alkali protease

<130> P01491504

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<400> 1

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly
20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp
50 55 60

Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly
65 70 75 80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser
85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln
100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn
115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn
130 135 140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala
145 150 155 160
Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala
165 170 175
Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe
180 185 190
Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg
195 200 205
Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly
210 215 220
Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe
225 230 235 240
Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met
245 250 255
Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe
260 265 270
Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala
275 280 285
Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn
290 295 300
Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr
305 310 315 320
Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser
325 330 335
Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser
340 345 350
Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu
355 360 365
Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp

370 375 380
Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu
385 390 395 400
Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val
405 410 415
Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile
420 425 430
Val Asn

<210> 2

<211> 1923

<212> DNA

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1920)

<223>

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(618)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (619)..()

<223>

<400> 2

atg aga aag aag aaa aag gtg ttt tta tct gtt tta tca gct gca 45

Met Arg Lys Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala

-205

-200

-195

gcg att ttg tcg act gtt gcg tta agt aat cca tct gca ggt ggt 90

Ala Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Ser Asn Pro Ser Ala Gly Gly

-190

-185

-180

gca agg aat ttt gat ctg gat ttc aaa gga att cag aca aca act 135

Ala Arg Asn Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr

-175

-170

-165

gat gct aaa ggt ttc tcc aag cag ggg cag act ggt gct gct gct 180

Asp Ala Lys Gly Phe Ser Lys Gln Gly Gln Thr Gly Ala Ala Ala

-160

-155

-150

ttt ctg gtg gaa tct gaa aat gtg aaa ctc cca aaa ggt ttg cag 225

Phe Leu Val Glu Ser Glu Asn Val Lys Leu Pro Lys Gly Leu Gln

-145

-140

-135

aag aag ctt gaa aca gtc ccg gca aat aat aaa ctc cat att atc 270

Lys Lys Leu Glu Thr Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Ile

-130

-125

-120

caa ttc aat gga cca att tta gaa gaa aca aaa cag cag ctg gaa 315

Gln Phe Asn Gly Pro Ile Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gln Leu Glu

-115

-110

-105

aaa aca ggg gca aag att ctc gac tac ata cct gat tat gct tac att 363

Lys Thr Gly Ala Lys Ile Leu Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile

-100

-95

-90

gtc gag tat gag ggc gat gtt aag tca gca aca agc acc att gag cac 411

Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val Lys Ser Ala Thr Ser Thr Ile Glu His

-85

-80

-75

-70

gtg gaa tcc gtg gag cct tat ttg ccg ata tac aga ata gat ccc cag 459

Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr Leu Pro Ile Tyr Arg Ile Asp Pro Gln

-65

-60

-55

ctt ttc aca aaa ggg gca tca gag ctt gta aaa gca gtg gcg ctt gat 507

Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser Glu Leu Val Lys Ala Val Ala Leu Asp

-50

-45

-40

aca aag cag aaa aat aaa gag gtg caa tta aga ggc atc gaa caa atc 555

Thr Lys Gln Lys Asn Lys Glu Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Gln Ile

-35

-30

-25

gca caa ttc gca ata agc aat gat gtg cta tat att acg gca aag cct 603

Ala Gln Phe Ala Ile Ser Asn Asp Val Leu Tyr Ile Thr Ala Lys Pro

-20

-15

-10

gag tat aag gtg atg aat gat gtt gcg cgt gga att gtc aaa gcg gat 651

Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp

-5

-1 1

5

10

gtg gct cag agc agc tac ggg ttg tat gga caa gga cag atc gta gcg 699
 Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala
 15 20 25

gtt gcc gat aca ggg ctt gat aca ggt cgc aat gac agt tcg atg cat 747
 Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His
 30 35 40

gaa gcc ttc cgc ggg aaa att act gca tta tat gca ttg gga cgg acg 795
 Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr
 45 50 55

aat aat gcc aat gat acg aat ggt cat ggt acg cat gtg gct ggc tcc 843
 Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser
 60 65 70 75

gta tta gga aac ggc tcc act aat aaa gga atg gcg cct cag gcg aat 891
 Val Leu Gly Asn Gly Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn
 80 85 90

cta gtc ttc caa tct atc atg gat agc ggt ggg gga ctt gga gga cta 939
 Leu Val Phe Gln Ser Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu
 95 100 105

cct tcg aat ctg caa acc tta ttc agc caa gca tac agt gct ggt gcc 987
 Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala
 110 115 120

aga att cat aca aac tcc tgg gga gca gca gtg aat ggg gct tac aca 1035

Arg Ile His Thr Asn Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr
 125 130 135

aca gat tcc aga aat gtg gat gac tat gtg cgc aaa aat gat atg acg 1083
 Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr
 140 145 150 155

atc ctt ttc gct gcc ggg aat gaa gga ccg aac ggc gga acc atc agt 1131
 Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser
 160 165 170

gca cca ggc aca gct aaa aat gca ata aca gtc gga gct acg gaa aac 1179
 Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn
 175 180 185

ctc cgc cca agc ttt ggg tct tat gcg gac aat atc aac cat gtg gca 1227
 Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala
 190 195 200

cag ttc tct tca cgt gga ccg aca aag gat gga cgg atc aaa ccg gat 1275
 Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp
 205 210 215

gtc atg gca ccg gga acg ttc ata cta tca gca aga tct tct ctt gca 1323
 Val Met Ala Pro Gly Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala
 220 225 230 235

ccg gat tcc tcc ttc tgg gcg aac cat gac agt aaa tat gca tac atg 1371
 Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met

240	245	250	
ggt gga acg tcc atg gct aca ccg atc gtt gct gga aac gtg gca cag			1419
Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln			
255	260	265	
ctt cgt gag cat ttt gtg aaa aac aga ggc atc aca cca aag cct tct			1467
Leu Arg Glu His Phe Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser			
270	275	280	
cta tta aaa gcg gca ctg att gcc ggt gca gct gac atc ggc ctt ggc			1515
Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly			
285	290	295	
tac ccg aac ggt aac caa gga tgg gga cga gtg aca ttg gat aaa tcc			1563
Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser			
300	305	310	315
ctg aac gtt gcc tat gtg aac gag tcc agt tct cta tcc acc agc caa			1611
Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln			
320	325	330	
aaa gcg acg tac tcg ttt act gct act gcc ggc aag cct ttg aaa atc			1659
Lys Ala Thr Tyr Ser Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile			
335	340	345	
tcc ctg gta tgg tct gat gcc cct gcg agc aca act gct tcc gta acg			1707
Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr			
350	355	360	

ctt gtc aat gat ctg gac ctt gtc att acc gct cca aat ggc aca cag 1755

Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln

365

370

375

tat gta gga aat gac ttt act tcg cca tac aat gat aac tgg gat ggc 1803

Tyr Val Gly Asn Asp Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly

380

385

390

395

cgc aat aac gta gaa aat gta ttt att aat gca cca caa agc ggg acg 1851

Arg Asn Asn Val Glu Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr

400

405

410

tat aca att gag gta cag gct tat aac gta ccg gtt gga cca cag acc 1899

Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr

415

420

425

ttc tcg ttg gca att gtg aat taa 1923

Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn

430

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

cggacgaata atgccagtga tccgaatggt cat 33

<210> 4

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

aaaggaatgg cgcctcatgc gaatctagtc ttc 33

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ttcagccaag catacagtgc tggtgccaga att 33

<210> 6

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gtcggagcta cggaaagcct ccgccaagc ttt 33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

atggcaccgg gaacgtacat actatcagca aga 33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gccggtgcag ctgacgtcgg ccttggctac ccg 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ggctacccga acggtagcca aggatgggga cga 33

【図面の簡単な説明】

【図 1】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 8 0 % 以上の相同性を有するプロテアーゼのアミノ酸配列を整列させた図である。

【図 2】

本発明アルカリプロテアーゼのホウ酸緩衝液 (pH 1 0, 5 0 mM) 中、7 0 ℃、1 0 分間処理時の耐熱性の向上を示す図である。

【図 3】

本発明アルカリプロテアーゼの 2 mM塩化カルシウム中 8 0 ℃、1 0 分間処理時の耐熱性の向上を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】

KP43 1:NDVARGIVKADVAQSSYGLYGQGGIVAVADTGLDTGRNDSMHEAFRGKITALYALGRTNNANDTNGHGTHTVAGSVLNGSTNKGMAPQA 90
KP9860 1:NDVARGIVKADVAQSSYGLYGQGGIVAVADTGLDTGRNDSMHEAFRGKITALYALGRTNNANDTNGHGTHTVAGSVLNGCATNKGMAPQA 90
KP9865 1:NDVARGIVKADVAQSSYGLYGQGGIVAVADTGLDTGRNDSMHEAFRGKITALYALGRTNNANDTNGHGTHTVAGSVLNGCATNKGMAPQA 90
E-1 1:NDVARGIVKADVAQNNYGLYGQGGIVAVADTGLDTGRNDSMHEAFRGKITALYALGRTNNANDPNGHGTHTVAGSVLNGSTNKGMAPQA 89
Ya 1:NDVARGIVKADVAQNNYGLYGQGGIVAVADTGLDTGRNDSMHEAFRGKITALYALGRTNNANDPNGHGTHTVAGSVLNGCATNKGMAPQA 89
SD-521 1:NDVARGIVKADVAQNNYGLYGQGGIVAVADTGLDTGRNDSMHEAFRGKITALYALGRTNNANDPNGHGTHTVAGSVLNGCATNKGMAPQA 89
A-1 1:NDVARGIVKADVAQSSYGLYGQGGIVAVADTGLDTGRNDSMHEAFRGKITALYALGRTNNANDPNGHGTHTVAGSVLNGSTNKGMAPQA 90
A-2 1:NDVARGIVKADVAQNNYGLYGQGGIVAVADTGLDTGRNDSMHEAFRGKITALYALGRTNNANDPNGHGTHTVAGSVLNGCATNKGMAPQA 89

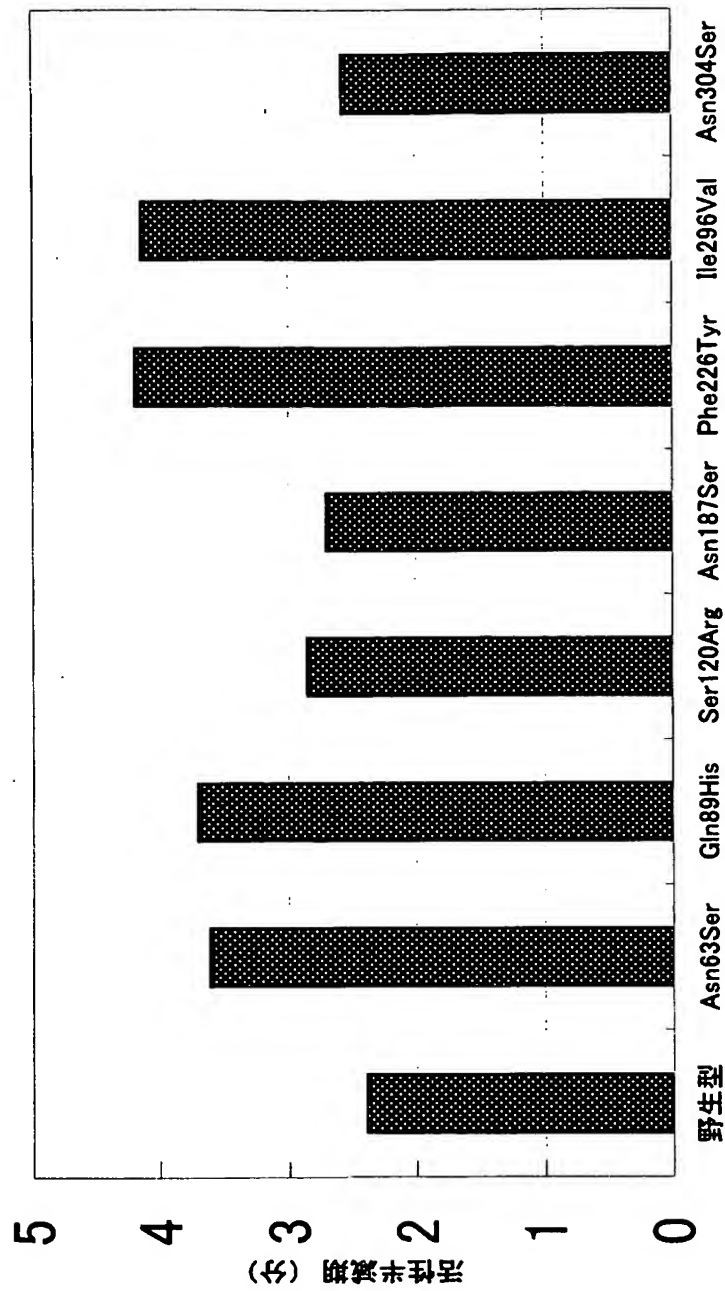
KP43 91:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAYSAGARIHTNSWGAHVNGAYTTDSRNVDYVRKNDMTILFAAGNEGFNGGTISAPGTAQNAI 180
KP9860 91:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAFSAGARIHTNSWGAHVNGAYTTDSRNVDYVRKNDMTILFAAGNEGFNGGTISAPGTAQNAI 180
KP9865 91:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAYSAGARIHTNSWGAHVNGAYTTDSRNVDYVRKNDMTILFAAGNEGFNGGTISAPGTAQNAI 180
E-1 90:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLTLFSQAWNAGARIHTNSWGAHVNGAYTTANSRQVDEYVRKNDMTILFAAGNEGFNGGTISAPGTAQNAI 179
Ya 90:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLTLFSQAWNAGARIHTNSWGAHVNGAYTTANSRQVDEYVRKNDMTILFAAGNEGFNGGTISAPGTAQNAI 179
SD-521 90:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLTLFSQAWNAGARIHTNSWGAHVNGAYTTANSRQVDEYVRKNDMTILFAAGNEGFNGGTISAPGTAQNAI 179
A-1 91:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNVSTLFSQAYSAGARIHTNSWGAHVNGAYTTDSRNVDYVRKNDMTILFAAGNEGFNGGTISAPGTAQNAI 180
A-2 90:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAYSAGARIHTNSWGAHVNGAYTTDSRNVDYVRKNDMTILFAAGNEGFNGGTISAPGTAQNAI 179

KP43 181:TVGATENLRPSFGSYADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPTGFIILSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 270
KP9860 181:TVGATENLRPSFGSYADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPTGFIILSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 270
KP9865 181:TVGATENLRPSFGSYADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPTGFIILSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 270
E-1 180:TVGATENLRPSFGSYADNINHVAQFSSRGATRDGRIPKDVMAPTGFIILSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 269
Ya 180:TVGATENLRPSFGSYADNINHVAQFSSRGATRDGRIPKDVMAPTGFIILSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 269
SD-521 180:TVGATENLRPSFGSYADNINHVAQFSSRGATRDGRIPKDVMAPTGFIILSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 269
A-1 181:TVGATENLRPSFGSYADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPTGFIILSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 270
A-2 180:TVGATENLRPSFGSYADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPTGFIILSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 269

KP43 271:HFVKNRGITPKPSLLKAALIAAADIGLGYPNQNGQWGRVTLDKSLNVAVVNESSSLSTSOKATYSFTATAGKPLKISLVSDAPASTTA 360
KP9860 271:HFVKNRGITPKPSLLKAALIAAADIGLGYPNQNGQWGRVTLDKSLNVAVVNESSSLSTSOKATYSFTATAGKPLKISLVSDAPASTTA 360
KP9865 271:HFVKNRGITPKPSLLKAALIAAADIGLGYPNQNGQWGRVTLDKSLNVAVVNESSSLSTSOKATYSFTATAGKPLKISLVSDAPASTTA 360
E-1 270:HFVKNRGITPKPSLLKAALIAAADIGLGYPNQNGQWGRVTLDKSLNVAVVNESSSLSTSOKATYSFTATAGKPLKISLVSDAPASTTA 359
Ya 270:HFVKNRGITPKPSLLKAALIAAADIGLGYPNQNGQWGRVTLDKSLNVAVVNESSSLSTSOKATYSFTATAGKPLKISLVSDAPASTTA 359
SD-521 270:HFVKNRGITPKPSLLKAALIAAADIGLGYPNQNGQWGRVTLDKSLNVAVVNESSSLSTSOKATYSFTATAGKPLKISLVSDAPASTTA 359
A-1 271:HFVKNRGITPKPSLLKAALIAAADIGLGYPNQNGQWGRVTLDKSLNVAVVNESSSLSTSOKATYSFTATAGKPLKISLVSDAPASTTA 360
A-2 270:HFVKNRGITPKPSLLKAALIAAADIGLGYPNQNGQWGRVTLDKSLNVAVVNESSSLSTSOKATYSFTATAGKPLKISLVSDAPASTTA 359

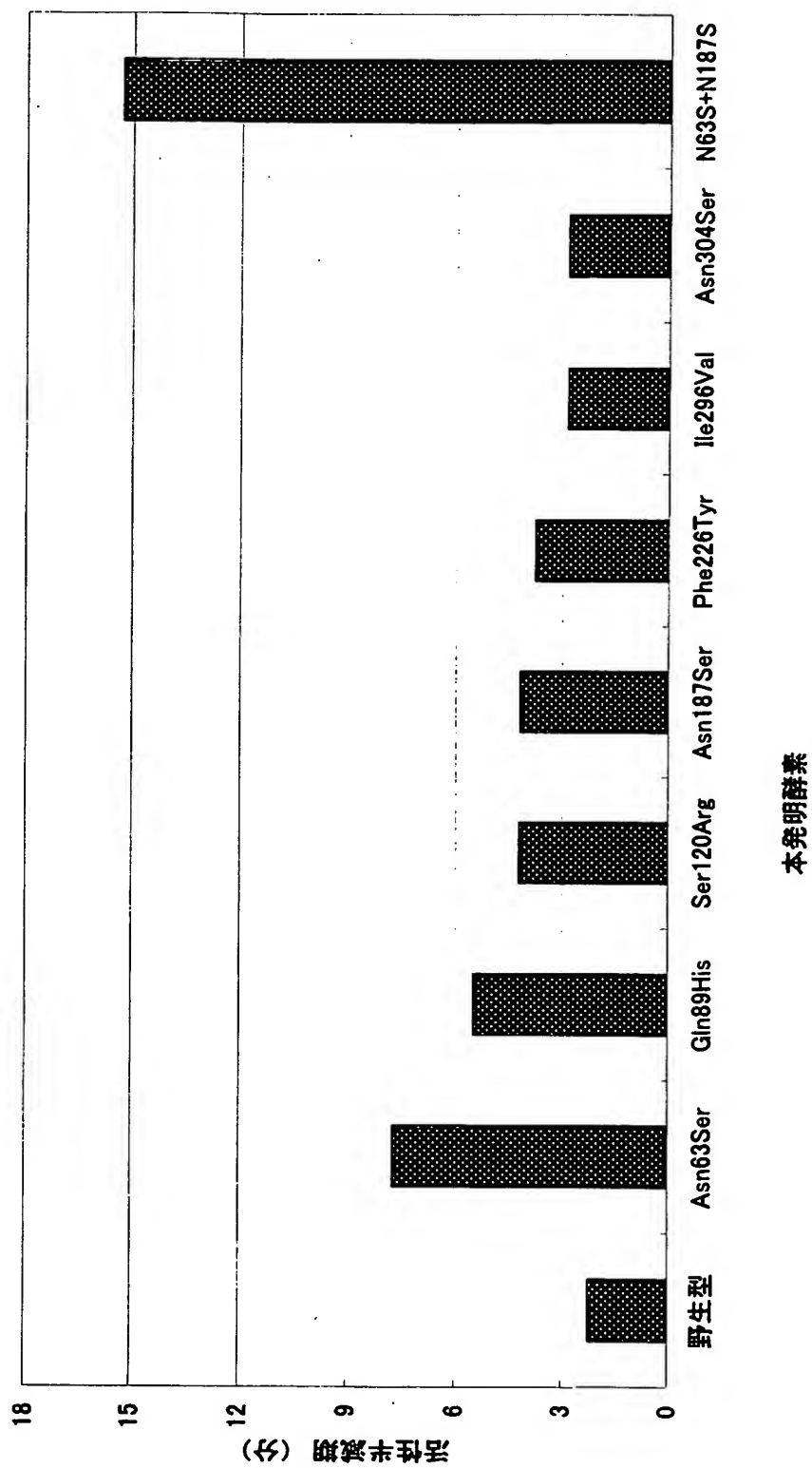
KP43 361:SVTLVNDLVLVITAPNGTQYVGNDFSPYDNNWDGRNNVENVFINAPQSGTITIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 434
KP9860 361:SVTLVNDLVLVITAPNGTQYVGNDFSPYDNNWDGRNNVENVFINAPQSGTITIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 434
KP9865 361:SVTLVNDLVLVITAPNGTQYVGNDFSPYDNNWDGRNNVENVFINAPQSGTITIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 434
E-1 360:SVTLVNDLVLVITAPNGTQYVGNDFSPYDNNWDGRNNVENVFINAPQSGTITIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 433
Ya 360:SVTLVNDLVLVITAPNGTQYVGNDFSPYDNNWDGRNNVENVFINAPQSGTITIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 433
SD-521 360:SVTLVNDLVLVITAPNGTQYVGNDFSPYDNNWDGRNNVENVFINAPQSGTITIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 433
A-1 361:SVTLVNDLVLVITAPNGTQYVGNDFSPYDNNWDGRNNVENVFINAPQSGTITIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 434
A-2 360:SVTLVNDLVLVITAPNGTQYVGNDFSPYDNNWDGRNNVENVFINAPQSGTITIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 433

【図 2】



本発明酵素

【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 複合汚れに対しても優れた洗浄性を有すると共に、耐熱性の向上したアルカリプロテアーゼを提供する。

【解決手段】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の (a) 63 位、(b) 89 位、(c) 120 位、(d) 63 位及び 187 位、(e) 226 位、(f) 296 位、(g) 304 位又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

(a) 位置：セリン、(b) 位置：ヒスチジン、(c) 位置：アルギニン、(d) 位置：セリン、(e) 位置：チロシン、(f) 位置：バリン、(g) 位置：セリン、であるアルカリプロテアーゼ；これをコードする遺伝子。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 0 6 7 0 8
受付番号	5 0 3 0 0 5 9 6 6 9 7
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 4 月 1 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 4月10日

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 0 6 7 0 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 9 1 8]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号

氏 名 花王株式会社